

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610024202.5

[51] Int. Cl.

C12N 15/51 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100395339C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/29 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

[22] 申请日 2006.2.28

[21] 申请号 200610024202.5

[73] 专利权人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市翔殷路 800 号

[72] 发明人 赵平 廖小玲 曹洁 戚中田

[56] 参考文献

WO0003021A2 1999.7.12

CN1609213A 2005.4.27

CN1465700A 2004.1.7

HCV 核心-包膜 E2 抗原融合基因 DNA 疫苗的构建及对小鼠的免疫应答实验. 姜春鹏等. 中华微生物学和免疫学杂志, 第 22 卷第 5 期. 2002

审查员 丁海

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 衷诚宣

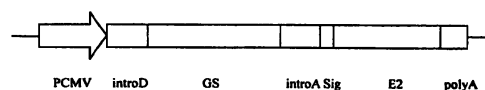
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法

[57] 摘要

本发明涉及生物医药工程技术领域, 全球 HCV 感染者约有 1.7 亿, 70% 以上的 HCV 感染会发展为慢性感染, HCV 包膜蛋白 E2 介导 HCV 与靶细胞的结合, 是涉及 HCV 感染性的最关键蛋白, 而 E2 蛋白属于低表达蛋白, 用基因重组方法获得哺乳动物细胞表达的该蛋白相当困难。本发明的目的在于提供一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法, 该方法构建了一种新型的哺乳动物细胞表达质粒, 该表达质粒高水平表达目标基因 E2 蛋白, 而低水平表达筛选标记谷氨酰氨合成酶。本发明能批量制备具有 HCV 包膜蛋白天然生物学功能以及抗原性的重组 HCV 包膜 E2 蛋白, 为 HCV 感染的血清学检测试剂以及 HCV 疫苗的开



- 1、一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法，其特征在于该方法构建了一种哺乳动物细胞表达质粒，该表达质粒将作为筛选标记的谷氨酰氨合成酶基因插入真核表达质粒载体 pCI-neo 的内含子基因的剪切供体与剪切受体位点之间，将丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 基因置于谷氨酰氨合成酶基因内含子之 3'端；并将丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 与人免疫球蛋白信号肽融合表达；所述的哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞。
- 2、根据权利要求 1 所述的一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法，其特征在于表达质粒中的丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 与人免疫球蛋白信号肽的融合基因的序列如 SEQ ID NO:1 所示。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法，其特征在于将其中的表达质粒转染哺乳动物细胞后，以甲硫酰硫酸胺筛选稳定转染的细胞克隆。
- 4、权利要求 1 或 2 所述的一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法在构建分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的工程细胞株中的应用。

一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法

技术领域：

本发明涉及生物医药工程技术领域，尤其涉及一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒（HCV）包膜蛋白 E2 的方法。

背景技术：

丙型肝炎病毒（HCV）是经血液传播的急、慢性肝炎的主要致病因子之一，目前全球 HCV 感染者约有 1.7 亿，60% 以上的 HCV 感染会发展为慢性感染。HCV 慢性感染与肝硬化、肝细胞癌具有高度相关性，并且还与淋巴瘤、冷球蛋白血症等密切相关。虽然目前已经建立了且已商品化的 HCV 感染诊断方法，但应用最广泛的血清学诊断方法，即酶联免疫吸附试验（ELISA）方法还有一定的漏检率，需要增加一些有诊断意义的病毒抗原。此外，目前还没有研制成功一种疫苗能有效预防 HCV 感染。

HCV 包膜蛋白包括 E1 和 E2 两种，其中 E2 介导 HCV 与靶细胞的结合，是涉及 HCV 感染性的最关键蛋白。有报道，在 ELISA 诊断试剂中加入 E2 合成肽能提高检测的敏感性，减少漏检，因此，有必要将该蛋白参入目前的基于 HCV 核心蛋白和非结构蛋白的 ELISA 检测中。由于 E2 蛋白在 HCV 与靶细胞结合中的关键作用，因此，该蛋白可作为 HCV 疫苗的重要候选抗原。但是，只有哺乳动物细胞表达的具有高度糖基化以及天然空间构型的 E2 蛋白才具有与靶细胞结合的生物学功能以及天然的抗原性，而 E2 蛋白属于低表达蛋白，用基因重组的方法获得哺乳动物细胞表达的该蛋白具有相当技术难度。这也是目前在 ELISA 方法中未引入 E2 蛋白的主要原因，也是妨碍 HCV 疫苗研究的重要原因。

发明内容：

本发明的目的在于提供一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法。

本发明提供了一种能用哺乳动物细胞高水平分泌表达 HCV 包膜 E2 蛋白的技术方法,首先构建了一种新型的哺乳动物细胞表达质粒载体,该质粒载体利用强的真核启动子高水平调控 HCV 包膜 E2 基因的表达,而借助于内含子的剪切功能控制筛选用的标记基因(谷氨酰胺合成酶基因,GS)仅低水平表达。将该表达质粒转染哺乳动物细胞,以甲硫酰硫酸胺(MSX)筛选稳定转染的细胞克隆,因 MSX 为 GS 的高效抑制剂,故只有染色体中高拷贝整合质粒编码基因的细胞才能存活,而存活的细胞能高水平表达质粒编码的目的基因--HCV 包膜 E2 基因。本发明中用目前最广泛用于哺乳动物细胞基因重组蛋白工程的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)为宿主细胞,以该质粒转染 CHO-K1 细胞,构建成功稳定高水平分泌表达 HCV 包膜 E2 蛋白的细胞株,并建立了该细胞株的无血清悬浮培养方法,因培养液中不含有牛血清等蛋白成分,从而能以简单的层析方法从培养液中纯化得到重组 HCV 包膜 E2 蛋白。

本发明的具体内容如下:

1. HCV 包膜 E2 蛋白胞外段基因的扩增: 根据 1b 基因型 HCV 包膜 E2 蛋白编码基因的核苷酸序列设计、合成引物,以聚合酶链反应(PCR)扩增 HCV 包膜 E2 蛋白胞外段基因,插入 T 克隆载体,对 E2 胞外段基因进行 DNA 测序。

2. 谷氨酰胺合成酶基因的克隆: 根据谷氨酰胺合成酶(GS)基因的序列,设计合成引物,以逆转录(RT)PCR 从中国仓鼠卵巢细胞(CHO)克隆 GS 基因,插入 T 克隆载体,对 GS 基因进行 DNA 测序。

3. 基于内含子剪切载体的构建: 将 GS 基因插入真核表达质粒载体 pCI-neo(美国 Promega 产品)的内含子基因的剪切供体(SD)与剪切受体(SA)位点之间,而将 HCV 包膜 E2 蛋白基因置于 GS 基因内含子之 3'端。

4. 表达质粒转染 CHO 细胞: 用脂质体将质粒转染 CHO 细胞,检测 HCV 包膜 E2 蛋白的表达。

5. 稳定表达 HCV 包膜 E2 蛋白的 CHO 细胞株的构建: 以低浓度的 GS 抑制剂--甲硫酰硫酸胺(MSX)筛选稳定转染的 CHO-K1 细胞克隆,再以浓度递增的 MSX 加压筛选高水平表达 HCV 包膜 E2 蛋白的 CHO-K1

细胞，然后逐渐以无血清培养液替代含小牛血清的培养液，使细胞完全适应于无血清培养生长。

6. 重组 HCV 包膜 E2 蛋白的抗原性鉴定：用单抗和多抗鉴定从细胞培养上清中的 HCV 包膜 E2 蛋白的抗原性。

本发明能批量制备具有 HCV 包膜蛋白天然生物学功能以及抗原性的重组 HCV 包膜 E2 蛋白，为 HCV 感染的血清学检测试剂以及 HCV 疫苗的开发奠定了基础，并可以为 HCV 分子病毒学研究提供重要材料。

附图说明

图 1: pCIDA-GS-E2-neo 质粒的结构

图 2: Western blot 分析胞浆内和分泌至培养上清中的 E2 蛋白（用羊抗 E2 多抗检测）

其中 1, 2: pCIDA-GS-E2-neo 转染的 CHO-K1 细胞裂解液

3: pCIDA-GS-E2-neo 转染的 CHO-K1 细胞培养上清

4: pCIDA-GS- neo 转染的 CHO-K1 细胞裂解液

图 3: dot blot 培养上清中的 E2 蛋白（用 E2 单抗检测）

其中 1, 2: pCIDA-GS- neo 转染的 CHO-K1 细胞培养上清

3, 4: pCIDA-GS-E2-neo 转染的 CHO-K1 细胞培养上清

图 4 分泌表达的 HCV 包膜 E2 蛋白的 SDS-PAGE 分析

具体实施方式：

下面结合附图和实施例对本发明作进一步描述。

实施例1：

1. HCV 包膜 E2 蛋白胞外段基因的扩增：

根据 1b 基因型 HCV 包膜 E2 蛋白编码基因的核苷酸序列设计、合成引物，以聚合酶链反应（PCR）扩增 HCV 包膜 E2 蛋白胞外段基因。为了使表达产物便于纯化，在 E2 胞外段基因的 3' 末端引入了编码 6 个组氨酸残基的核苷酸序列。PCR 扩增的模板质粒 pGEM-HCJ4 含有 1b 型 HCV 基因全序列，为美国国立卫生研究院 Yanagi M 博士构建、提供（参见 *Virology*. 1998;244(1):161-72）。DNA 扩增用试剂为美国 Promega 产品。

引物序列：（下游引物 E2R 含 SalI 酶切位点）

E2F: 5'-GAGACCCACACGACGGGGAG-3'

E2R: 5'-GTCGACAACTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTGACCTATCCCTGTCC-3'

在 0.5 毫升离心管建立以下反应体系：

| | |
|-----------------------|-------------|
| 质粒 pGEM-HCJ4 | 10 ng |
| 10× Pfu 聚合酶反应缓冲液 | 5 μ l |
| 引物 E2F (5 mM) | 2 μ l |
| 引物 E2R (5 mM) | 2 μ l |
| dNTP (10mM) | 1 μ l |
| Pfu 聚合酶 (3U/ μ l) | 0.5 μ l |

补充双蒸灭菌水至总反应体积 50 μ l，用 MJ PTC-100 型 PCR 仪进行热循环反应：94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟，94 $^{\circ}$ C 变性 40 秒，60 $^{\circ}$ C 退火 40 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟 20 秒，共进行 30 个循环，然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟，温度降至 4 $^{\circ}$ C 结束反应。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，将目的条带回收。

2. E2 基因与人免疫球蛋白信号肽基因的拼接：

为了使重组 HCV 包膜 E2 蛋白能分泌表达，在该基因的 5' 末端引入人免疫球蛋白信号肽基因。

合成引物：（上游引物 ISF 含 NheI 酶切位点）

ISF: 5'-GCTAGCGCCACCATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGTGGGTGCC-3'

ISR: 5'-CTCCCCGTCGTGTGGGTCTCGGCGTCGCCGGTGCTGCCGGGCACCCACAGCAGCAGC-3'

在 0.5 毫升离心管建立以下反应体系：

| | |
|--------------------------|-------------|
| 10× Taqase 反应缓冲液 | 5 μ l |
| 引物 ISF (5 mM) | 2 μ l |
| 引物 ISR (5 mM) | 2 μ l |
| dNTP (10mM) | 1 μ l |
| Taqase 聚合酶 (5U/ μ l) | 0.2 μ l |

补充双蒸灭菌水至总反应体积 50 μ l，用 MJ PTC-100 型 PCR 仪进行热循环反应：94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟，94 $^{\circ}$ C 变性 20 秒，60 $^{\circ}$ C 退火 30 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒，共进行 30 个循环，然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟，温度降至 4 $^{\circ}$ C 结束反应。

再进行拼接反应：

在 0.5 毫升离心管建立以下反应体系：

| | |
|--------------------------|-------------|
| E2 胞外段基因回收产物 | 2 μ l |
| 人免疫球蛋白信号肽基因反应产物 | 5 μ l |
| 10 \times Pfu 聚合酶反应缓冲液 | 5 μ l |
| 引物 ISF (5 mM) | 2 μ l |
| 引物 E2R (5 mM) | 2 μ l |
| dNTP (10mM) | 1 μ l |
| Pfu 聚合酶 (3U/ μ l) | 0.5 μ l |

补充双蒸灭菌水至总反应体积 50 μ l，用 MJ PTC-100 型 PCR 仪进行热循环反应：94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟，94 $^{\circ}$ C 变性 40 秒，60 $^{\circ}$ C 退火 40 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟 20 秒，共进行 30 个循环，然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟，温度降至 4 $^{\circ}$ C 结束反应。然后向反应管中加入 Taqase 0.5U，72 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，将目的条带回收，与 T 载体 pMD18T 连接，连接反应体系如下：

在 0.5 毫升离心管建立以下反应体系：

| | |
|--------------------------|-------------|
| 回收的 E2 融合基因 | 6.5 μ l |
| 5 \times T4 DNA 连接酶缓冲液 | 2 μ l |
| T 载体 pMD18T | 0.5 μ l |
| T4 DNA 连接酶 (2U/ μ l) | 1 μ l |

混匀，置于 16 $^{\circ}$ C 水浴 16 小时，取 5 μ l 转化感受态大肠杆菌 DH5 α ，得到的氨苄青霉素抗性菌落接种于含有氨苄青霉素 100 μ g/ml 的 LB 培养液，振荡培养过夜，再提取重组质粒进行酶切鉴定，命名为 pMD-E2，其中的人免疫球蛋白信号肽与 HCV 包膜蛋白 E2 融合基因的序列如 SEQ ID NO:1 所示。

3. CHO 细胞 GS 基因的克隆

用含有 5% 新生牛血清的 DMEM 培养液传代培养 CHO-K1 细胞（购自美国 ATCC），细胞达到 80% 汇合时，用 Trizol Reagent（美国 Gibco 产品）抽提细胞总 RNA，操作参照使用说明进行。得到的细胞总 RNA 溶解于 DEPC 处理的灭菌重蒸水。

逆转录反应 (RT)： 逆转录反应试剂为美国 Promega 产品。

取 RNA 2 μl (约 5 μg)，置于一只 50 μl 离心管内，再依次加入以下各组分：

5 \times AMV 逆转录反应缓冲液 5 μl

dNTP (10 mM) 1 μl

oligo (dT)15 (5 pmol/ μl) 1 μl

于 70 $^{\circ}\text{C}$ 热水浴 5 分钟，再迅速置于冰水浴，加入以下组分：

RNA 酶抑制剂 (30 U/ μl) 2 μl

AMV 逆转录酶 (5 U/ μl) 1 μl

加 DEPC 处理的灭菌重蒸水至终体积 25 μl 。

混匀，于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 分钟，再 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分钟灭活逆转录酶，立即进行 PCR 扩增 GS 基因。

根据 GS 基因的序列设计、合成引物 (上下游引物 GSF、GSR 中分别引入 ApaI 和 SacII 酶切位点)：

GSF: 5' -GGGCCCATGGCCACCTCAGCAAGTTCC-3'

GSR: 5' -CCGCGGTTAGTTTTTGTATTGGAAGGGCTCGTCGCC-3'

以 RT 产物为模板扩增 GS 基因，扩增产物插入 T 载体 pMD18T，得到重组质粒命名为 pMD-GS，再对 GS 基因进行 DNA 测序，操作方法同前。测序所得的 GS 基因序列与 Genbank accession X03495 一致。

4. 基于内含子筛选标记的表达载体的构建

以真核表达载体 pCI-neo (美国 Promega 产品) 为基本框架，将 GS 基因插入内含子基因中，因内含子基因在转录以后从 mRNA 链上被剪切，其中的编码序列由于在 5' 端缺少帽状结构和 3' 端缺少多聚腺苷序列而仅能低水平表达，因此将筛选标记基因插入内含子中能提高筛选得到的细胞克隆的阳性表达率。

根据 pCI-neo 载体中的 CMV 巨细胞病毒启动子/增强子以及嵌合内含子的序列合成引物：

inDF: 5' -GAGCTCGTTTAGTGAACCG-3' (含 SacI 酶切位点)

inDR: 5' -GGGCCCTCTGTCTCGACAAGCCCAG-3' (含 ApaI 酶切位点)

inAF: 5' -GGGCCCATACCGCGGAAGACTCTTGCGTTTCTG-3' (含 ApaI、SacII 酶切位点)

inAR: 5' -GTCGACCTATAGTGAGTCGT-3' (含 NheI 酶切位点)

以质粒 pCI-neo 为模板, 以引物 inDF、inDR 扩增内含子剪切供体位点片段, 以引物 inAF、inAR 扩增内含子剪切受体位点片段。分别将内含子剪切供体位点片段和受体位点片段插入 T 载体 pMD18T, 得到重组质粒命名为 pMD-inD、pMD-inA, 再进行 DNA 测序, 操作方法同前。

以 SacI、ApaI 酶切质粒 pMD-inA, 回收切出的内含子剪切供体位点片段 inD; 以 ApaI、NheI 酶切质粒 pMD-inA, 回收切出的内含子剪切供体位点片段 inA。

以 SacI、NheI 酶切质粒 pCI-neo, 切除质粒中的内含子基因, 回收载体大片段, 将载体大片段与 inD、inA 片段连接, 得到的重组质粒命名为 pCIDA-neo, 该载体的特点在于, 内含子中引入了两个酶切位点 ApaI 和 SacII, 可以插入筛选标记基因。

将质粒 pMD-GS 以 ApaI 和 SacII 酶切, 切出的 GS 基因插入 pCIDA-neo 中, 得到重组质粒 pCIDA-GS-neo。其特点在于 GS 基因插入在内含子之中。

5. HCV 包膜 E2 基因表达载体的构建:

质粒 pMD-E2 以 NheI 和 SalI 酶切, 回收切出的 HCV 包膜 E2 基因, 将该基因插入经过 NheI 和 SalI 酶切的线性化载体 pCIDA-GS-neo, 即得到 E2 表达载体 pCIDA-GS-E2-neo, 其表达调控结构如图 1 所示: PCMV 为巨细胞病毒启动子, introD 为内含子供体序列, GS 为谷氨酰氨合成酶基因, introA 为内含子受体序列, Sig 为人免疫球蛋白信号肽, E2 为 HCV 包膜 E2 基因, polyA 为 SV40 病毒多聚腺苷酸序列。

6. HCV 包膜 E2 蛋白在 CHO 细胞中的表达

用含有 5% 新生牛血清的 DMEM 培养液传代培养 CHO-K1 细胞, 细胞 80% 融合时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 细胞传代接种于 35 mm 细胞培养皿, 次日将 2 μ g 质粒 pCIDA-GS-E2-neo 及对照质粒 pCIDA-GS-neo 分别与 10 μ l 脂质体转染试剂 Lipofectamine (美国 Invitrogen 产品) 混匀, 转染 CHO-K1 细胞, 操作按照使用说明进行。将细胞培养皿置于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳、饱和湿度的细胞培养箱中, 12 小时后加 1ml 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 继续培养 48 小时。然后冻融裂解细胞, 细胞裂解液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 再进

行 western blot 检测，E2 抗体为山羊抗 HCV 包膜 E2 蛋白多抗（美国 Biodesign 产品），酶标抗体为辣根过氧化物酶（HRP）标记的驴抗山羊 IgG（华美生物工程有限公司产品）。同时将培养上清进行浓缩，浓缩液进行 western blot 检测。操作均参照《分子克隆实验指南第二版》（科学出版社，1995）进行。结果如图 2，可见细胞裂解液中存在各种不同分子量形式的 E2 蛋白，最高分子量的蛋白为完全糖基化 E2，而其余为部分糖基化 E2，其中分泌至培养上清中的主要为完全糖基化的 E2。细胞培养上清用抗 E2 单克隆抗体（美国 Biodesign 产品）进行 dot blot 检测，如图 3 所示，也能检测到分泌至培养上清中 E2 蛋白。

7. 稳定表达 HCV 包膜 E2 蛋白的 CHO-K1 细胞株的构建：

将质粒 pCIDA-GS-E2-neo 转染于接种 24 孔板中的 CHO-K1 细胞，48 小时后，将细胞以 0.25%胰蛋白酶消化，接种于 5 个 100 mm 细胞培养皿，用含有 10%透析的胎牛血清的 GMEM-S 培养液（JRH 产品）培养，加甲硫酰硫酸胺（MSX）（Sigma 产品）至终浓度 25 $\mu\text{mol/L}$ ，3-4 天后细胞开始死亡，两周后培养皿形成由单个细胞增殖而形成的集落（克隆），挑选单个克隆，接种于 24 孔板，继续用 25 $\mu\text{mol/L}$ MSX 的 GMEM-S 培养液培养，一周后培养上清用 dot blot 法检测 E2 蛋白的表达，对表达水平最高的克隆以胰蛋白酶消化，以 105 个细胞/孔接种 96 孔板，用浓度递增的 MSX（100-1000 $\mu\text{mol/L}$ ）加压培养，2 周后，对生长良好的细胞检测其培养上清中 E2 的表达。表达量最高者再进行有限稀释，接种于 96 孔板，对单个细胞克隆进行表达水平分析，得到的最高表达克隆作为待用的细胞株，命名为 CR9。

8. 无血清培养

用无血清培养基（JRH 产品）逐渐替代 GMEM-S 培养基，使 CR9 细胞逐渐适应完全无血清培养基而从贴壁转为悬浮生长。将悬浮细胞改用摇瓶培养，培养体积 150 毫升。由于无血清培养液中除了细胞分泌表达 E2 外，其他蛋白含量（来源于少数死亡的细胞）极低，因而极大方便了蛋白纯化，培养上清离心、超滤以后，用镍离子金属螯合层析的方法进行初步纯化（试剂采用 Qiagen 产品），每一百毫升培养液中

可得到 E2 蛋白 25 毫克。图 4 为不同批次纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军第二军医大学

<120> 一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的方法

<130> 说明书, 权利要求书

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 921

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgcccgg cagcaccggc      60
gacgccgaga cccacacgac ggggaggggtg gccggccaca ccacctccgg gttcacgtcc      120
cttttctcat ctggggcgtc tcagaaatc cagcttgtga ataccaacgg cagctggcac      180
atcaacagga ctgccctaaa ttgcaatgac tcctccaaa ctgggttctt tgccgcgctg      240
ttttacgcac acaagttcaa ctcgctccggg tgcccggagc gcatggccag ctgccgcccc      300
attgactggg tcgcccaggg gtggggcccc atcacctata ctaagcctaa cagctcggat      360
cagaggcctt attgctggca ttacgcgctt cgaccgtgtg gtgtcgtacc cgcgtcgcag      420

```

| | |
|---|-----|
| gtgtgtggtc cagtgtattg tttcacccca agccctgttg tggtagggac caccgatcgt | 480 |
| tccggtgtcc ctacgtatag ctggggggag aatgagacag acgtgatgct cctcaacaac | 540 |
| acgcgtccgc cacaaggcaa ctggttcggc tgtacatgga tgaatagtac tgggttcact | 600 |
| aagacgtgcg gaggtccccc gtgtaacatc gggggggtcg gtaaccgcac cttgatctgc | 660 |
| cccacggact gcttccggaa gcaccccgag gctacttaca caaatgtgg ctgggggccc | 720 |
| tggttgacac ctaggtgcct agtagactac ccatacaggc tttggcacta ccctgcact | 780 |
| ctcaattttt ccatctttaa ggtaggatg tatgtggggg gcgtggagca caggctcaat | 840 |
| gccgcatgca attggactcg aggagagcgc tgtaacttgg aggacagga taggtcagaa | 900 |
| caccaccacc accaccactg a | 921 |

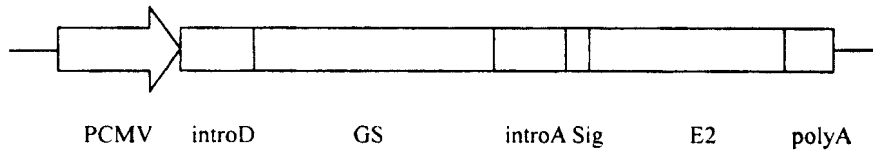


图 1

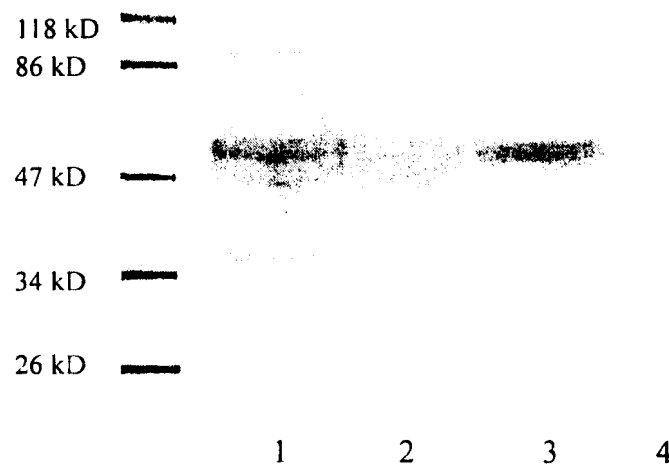


图 2

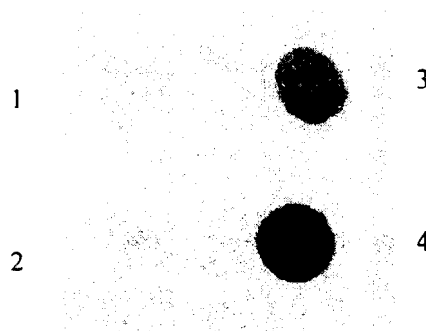


图 3



图 4

| | | | |
|---------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白E2的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN100395339C | 公开(公告)日 | 2008-06-18 |
| 申请号 | CN200610024202.5 | 申请日 | 2006-02-28 |
| 申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第二军医大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第二军医大学 | | |
| [标]发明人 | 赵平 廖小玲 曹洁 戚中田 | | |
| 发明人 | 赵平 廖小玲 曹洁 戚中田 | | |
| IPC分类号 | C12N15/51 C12N15/52 C12N15/85 G01N33/53 G01N33/535 A61K38/16 A61K39/29 A61P1/16 | | |
| 审查员(译) | 丁海 | | |
| 其他公开文献 | CN1821411A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及生物医药工程技术领域，全球HCV感染者约有1.7亿，70%以上的HCV感染会发展为慢性感染，HCV包膜蛋白E2介导HCV与靶细胞的结合，是涉及HCV感染性的最关键蛋白，而E2蛋白属于低表达蛋白，用基因重组方法获得哺乳动物细胞表达的该蛋白相当困难。本发明的目的在于提供一种用哺乳动物细胞高效分泌表达丙型肝炎病毒包膜蛋白E2的方法，该方法构建了一种新型的哺乳动物细胞表达质粒，该表达质粒高水平表达目标基因E2蛋白，而低水平表达筛选标记谷氨酰氨合成酶。本发明能批量制备具有HCV包膜蛋白天然生物学功能以及抗原性的重组HCV包膜E2蛋白，为HCV感染的血清学检测试剂以及HCV疫苗的开发奠定了基础，并可以为HCV分子病毒学研究提供重要材料。

